

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1913-1914. — N° 154

LA
RECHERCHE DU COLIBACILLE
DANS
LES EAUX DE BOISSON
PAR LA MÉTHODE AU NEUTRAL-ROT

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 29 Juillet 1914

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Maurice JAUFFRET

Né le 10 novembre 1891, à Toulon (Var).

Diplômé d'études d'hygiène de l'Université de Lyon.



LYON

A. REY, IMPRIMEUR-ÉDITEUR DE L'UNIVERSITÉ

4, RUE GENTIL, 4

Juillet 1914

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1913-1914. — N° 154

LA
RECHERCHE DU COLIBACILLE
DANS
LES EAUX DE BOISSON
PAR LA MÉTHODE AU NEUTRAL-ROT

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 29 Juillet 1914

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Maurice JAUFFRET

Né le 10 novembre 1891, à Toulon (Var).

Diplômé d'études d'hygiène de l'Université de Lyon.



LYON

A. REY, IMPRIMEUR-ÉDITEUR DE L'UNIVERSITÉ

4, RUE GENTIL, 4

—
Juillet 1914



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. HUGOUNENQ DOYEN.
J. COURMONT ASSESEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CHAUVEAU, AUGAGNEUR, SOULIER, TRIPIER, CAZENEUVE, LÉPINE, PIERRET,
BEAUVISAGE, LACASSAGNE.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. TEISSIER
Cliniques chirurgicales.	ROQUE
Clinique obstétricale et Accouchements	BARD
Clinique ophtalmologique	TIXIER
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BÉRARD
Clinique des maladies nerveuses et mentales	FABRE
Clinique des maladies des enfants	ROLLET
Clinique des maladies des femmes	NICOLAS
Physique médicale	LÉPINE (J.)
Chimie médicale et pharmaceutique	WEILL
Chimie organique et Toxicologie	POLLOSSON (A.)
Matière médicale et Botanique	CLUZET
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	HUGOUNENQ
Anatomie	MOREL
Anatomie générale et Histologie	MOREAU
Physiologie.	GUART
Pathologie interne.	TESTUT
Pathologie et Thérapeutiques générales	RENAUT
Anatomie pathologique.	MORAT
Médecine opératoire	COLLET
Médecine expérimentale et comparée	LESIEUR
Médecine légale.	PAVIOT
Hygiène :	POLLOSSON (M.)
Thérapeutique	COURMONT (P.)
Pharmacologie	ETIENNE MARTIN
	COURMONT (J.)
	PIC
	FLORENCE

PROFESSEURS ADJOINTS

Physiologie, cours complémentaire	MM. DOYON
Maladies des oreilles, du nez et du larynx	LANNOIS
Pathologie externe.	VALLAS
Maladies des voies urinaires	ROCHET

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Chimie minérale	MM. BARRAL,	agrégé
Propédeutique chirurgicale	BÉRARD,	—
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN,	—
Chirurgie infantile	NOVE-JOSSERAND,	—
Accouchements	COMMANDEUR,	—
Embryologie	LATARJET,	—
Anatomie topographique	PATEL,	—
Botanique	BRETIN,	—
Chirurgie expérimentale	VILLARD,	—
Clinique infantile	MOURIQUAND,	—
Déontologie et médecine professionnelle	X....,	—

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
BARRAL	LATARJET	MOURIQUAND	FROMENT
COMMANDEUR	BPETIN	ARLOING (F.)	THÉVENOT (Lucien)
NEVEU-LEMAIRE	LERICHE	GUILLEMAR	PIÉRY
LAROYENNE	THÉVENOT (Léon)	POLICARD	COTTE
VORON	TAVERNIER	GARIN	DUROUX
NOGIER	CADE	SAVY	

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. LESIEUR, Président ; FLORENCE, Assesseur ;
MM. NEVEU-LEMAIRE et ARLOING, Agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

*Auxquels je dois tout, je dédie
ce modeste travail bien faible hom-
mage de respectueuse affection et de
vive et profonde reconnaissance.*

A MON GRAND-PÈRE ET A MA GRAND'MÈRE

A MON ONCLE ET A MA TANTE

A MON FRÈRE

A MES PARENTS — A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JULES COURMONT

Médecin des Hôpitaux,
Membre du Conseil supérieur d'Hygiène de France,
Correspondant de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'honneur,

Nous avons travaillé pendant un an dans son laboratoire. Nous le remercions vivement de nous l'avoir permis et l'assurons de notre profonde gratitude.

A mon Président de Thèse :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LESIEUR

Directeur du Bureau d'Hygiène de la Ville de Lyon,
Médecin des Hôpitaux.

Nous le remercions du très grand honneur qu'il nous fait en présidant notre thèse et nous l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROCHAIX

Chargé de cours,
Chef de Travaux pratiques d'hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon.

Nous le remercions de nous avoir donné l'idée de ce travail. Il n'a ménagé ni son temps ni ses conseils pour nous permettre de le mener à bien. Qu'il reçoive ici l'assurance de notre vive gratitude.

A NOS MAITRES

des Hôpitaux et de la Faculté



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LA
RECHERCHE DU COLIBACILLE
DANS
LES EAUX DE BOISSON
PAR LA MÉTHODE AU NEUTRAL-ROT

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

REVUE GÉNÉRALE DES PRINCIPAUX PROCÉDÉS

L'importance de la recherche du *colibacille* dans les eaux n'est plus à démontrer.

Depuis les travaux de RODET et ROUX (45), en 1889, et depuis les nombreuses publications que ces travaux ont suscitées, le *colibacille* a vu son importance devenir considérable au point de vue de l'analyse des eaux.

Le colibacille peut, en effet, dans certaines circonstances, devenir pathogène : on connaît les *colibacilloses*.

Mais là n'est pas véritablement son importance : c'est comme *indice de pollution* de l'eau par les

matières fécales, les urines, les purins, les fumiers, etc., que sa découverte dans l'eau a sa principale signification hygiénique. Le colibacille se trouve d'une façon constante dans tous les excreta ; toute eau qui aura été contaminée renfermera donc du colibacille et sa seule présence devra faire considérer cette eau comme impotable. (PETRUSCHKY et PUSCH (37), VINCENT (59).)

D'autre part, il est extrêmement difficile d'isoler le *bacille d'Eberth*, même des eaux qui ont engendré une épidémie de fièvre typhoïde. Le *colibacille* l'accompagnant toujours et étant de recherche relativement facile, c'est souvent ce dernier microbe qu'on se contente de rechercher. Une eau colibacillifère, en dehors de la contamination générale dont elle a été l'objet, peut, à un moment donné, devenir typhogène.

L'analyse bactériologique qualitative d'une eau se réduit presque toujours à la recherche du colibacille. (J. COURMONT (9).)

*
**

Aussi un grand nombre de méthodes pour déceler le colibacille dans l'eau ont-elles vu le jour durant ces dernières années.

Nous allons rapidement les énumérer.

A. — Procédés par la température.

Ce procédé, très simple, a été indiqué par RODET (46) en 1889. Il utilise ce fait que, seuls ou à peu près, le *colibacille* et le *bacille d'Eberth*, parmi

les microbes des selles ou des eaux, végètent à la température de 45 degrés.

On ensemence quelques ballons de bouillon, on les place quarante-huit heures dans une étuve à + 44°5. Au bout de ce temps, si les ballons sont troubles, il y a de fortes présomptions pour que l'on ait affaire à du colibacille.

EIJKMANN (10), en 1904, propose d'ensemencer 1 centimètre cube d'eau dans 10 centimètres cubes de solution peptonée, glucosée et de mettre à l'étuve à 46 degrés.

S'il y a du colibacille, en vingt-quatre heures le glucose fermente et il y a production de gaz

Cependant, ces derniers temps, en 1913, BORNAND (2), étudiant cette méthode, trouve qu'elle n'est applicable que lorsque l'infection de l'eau est récente. Les colibacilles ayant séjourné un certain temps (quatre mois et demi dans le cas particulier) à des températures basses (5, 7, 18 degrés), s'y adaptent et, dès lors, on ne pourrait les faire multiplier à 46 degrés.

B. — Procédés à l'acide phénique.

CHANTEMESSE et VIDAL ont, les premiers, utilisé (1887) la possibilité de cultiver le *colibacille* et le *bacille d'Eberth* en milieux à l'acide phénique pour la diagnose de ces deux microbes.

Ils ajoutent IV à V gouttes d'une solution d'acide phénique à 1/20° par 10 centimètres cubes de gélatine. Ils cultivent en boîtes de Petri ou en tubes

d'Esmarch. Seuls, ou à peu près, les deux microbes mentionnés végètent.

VINCENT (57), en 1890, combine l'action de l'acide phénique et de la température.

Il introduit dans des ballons 10, 50, 100, 150 centimètres cubes de l'eau à analyser. Il ajoute, par 10 centimètres cubes d'eau, XX gouttes d'une solution saturée de peptone et XX gouttes d'une solution concentrée d'acide phénique. Il met à l'étuve à 42 degrés et examine au bout de vingt-quatre heures. Les ballons, troubles, contiennent du colibacille.

PÉRÉ (38) (1891) transforme un certain volume d'eau (600-700 centimètres cubes) en milieu de culture, en lui ajoutant du bouillon peptoné (150 centimètres cubes) et une solution d'acide phénique à 5 pour 100 (20 centimètres cubes). Il chauffe de + 32 degrés à + 34 degrés et, dès qu'un trouble se produit, il réensemence en bouillon phéniqué. Après trois passages, faits dans les mêmes conditions, tous les microbes, sauf le *colibacille* et le *bacille d'Eberth*, ont disparu.

PARIETTI (36) (1890), dans des tubes de bouillon de 10 centimètres cubes, ajoute III, VI, IX gouttes d'une solution à 5 pour 100 d'acide phénique et de 4 pour 100 d'acide chlorydrique. Il lesensemence en série avec I, II, III gouttes, etc., d'eau soumise à l'analyse.

Le *colibacille* ou le *bacille d'Eberth* amènent un trouble au bout de vingt-quatre heures, même dans les tubes où la concentration d'acide phénique est la plus forte. Dans les tubes, où la solution est plus

diluée, les microbes ordinaires peuvent amener un trouble, mais au bout de quarante-huit heures seulement.

Il faut d'ailleurs remarquer que, dans ces procédés, où l'on utilise les bouillons phéniqués, les constatations n'ont de valeur que si elles sont faites au bout de vingt-quatre heures au plus tard. Passé ce délai, les autres microbes des eaux peuvent commencer à végéter.

**C. — Procédés utilisant la concentration
ou l'enrichissement.**

VALLET (1901) entraîne les microbes dans un précipité obtenu en ajoutant, par 20 centimètres cubes d'eau, IV gouttes d'une solution saturée d'hyposulfite de soude et IV gouttes d'une solution saturée d'hyposulfite de plomb. Après décantation, il dissout le dépôt en ajoutant goutte à goutte la solution saturée d'hyposulfite de soude. On répartit dans des tubes 10 centimètres cubes de *gélatine d'Elsner* modifiée par GRIMBERT et II à IV gouttes de cette dissolution.

Le *colibacille* pousse au bout de trente-six heures.

BORDAS (1901) filtre par aspiration dans une bougie l'eau à analyser. Il nettoie la bougie avec de l'eau stérilisée et ensemence cette eau d'après les procédés usuels.

VENEMA (56) (1906) emploie le procédé que RINGELING avait utilisé pour le lait. Il ensemence 5 centimètres cubes d'eau dans 50 centimètres cubes de bouillon acide (bouillon ordinaire non alcalinisé). Après vingt-quatre heures à 37 degrés, il y a assez

de colis pour les faire apparaître sur des plaques de gélatine, alors qu'auparavant on n'obtenait aucun résultat.

FEDEROLF (1909) précipite par le sulfate de fer et ensemence le précipité sur gélose dans des boîtes de Petri.

D. — Procédé de la culture filtrante.

C'est le procédé décrit par CAMBIER. Dans un tube d'Esmarch, rempli au tiers de bouillon, on place une bougie filtrante à l'intérieur de laquelle se trouve le produit de filtration ou de centrifugation de l'eau à analyser.

LESIEUR (30) a montré que le *colibacille* et le *bacille d'Eberth* passent de l'intérieur de la bougie dans le tube d'Esmarch au bout de dix-huit heures, les autres microbes mettant de vingt-quatre à cent vingt heures pour traverser.

Il suffira donc d'examiner au bout de vingt heures le bouillon d'après un des procédés usuels.

P. CARNOT et GARNIER utilisent comme appareil de filtration un tube en U à branches de diamètre inégal, et dont la plus large contient une masse de sable, surmontée d'une petite couche de bouillon, l'autre contenant le liquide à examiner. On examine dès que le bouillon se trouble.

E. — Procédés par culture sur gélatines spéciales.

La gélatine d'ELSNER (11), qu'avait proposée cet auteur pour la différenciation du *colibacille* et du

bacille d'Eberth a perdu toute sa valeur comme moyen différentiel. Mais, pour l'isolement du *colibacille* de l'eau, elle constitue toujours, combinée avec les milieux phéniqués, un excellent procédé employé journellement dans nombre de laboratoires.

La *gélatine de Piorkowsky* et la *gélatine de Remy* sont utilisées comme pour une analyse d'eau ordinaire.

F. — Procédés utilisant les milieux colorés.

Nous citerons :

La *gélose fuchsinée de Gasser* sur laquelle le *colibacille* pousse en rouge.

La *gélose lactosée et colorée à la rubine de Ramond*, et la *gélose fuchsinée d'Endo*, fortement préconisée par GAGE (15), en 1908, milieux incolores que les colonies de *colibacilles* virent au rouge.

La *gélose lactosée et tournesolée de Drigalsky-Conradi*, où le *colibacille* végète en rouge sur fond bleu.

Le *bouillon lactosé et tournesolé* qui vire au rouge sous l'influence du *colibacille*.

Le milieu de HARRISON (1909), à base d'esculine et de citrate de fer. Le *colibacille*, agissant sur l'esculine, fait dégager de l'esculétine qui, se combinant au citrate de fer, donne un sel brun noirâtre.

Toutefois, il faut signaler que KLOTZ et RACHIN (27), en 1910, ont contesté la valeur de ce milieu.

G. — Procédé au rouge neutre.

C'est ce procédé que nous allons maintenant étudier en détail.

CHAPITRE II

MÉTHODE AU NEUTRAL-ROT

PRINCIPE. — HISTORIQUE. — MANUEL OPÉRATOIRE

Le procédé dit au neutral-rot est basé sur ce fait que le *colibacille*, en culture sur milieux au rouge neutre, réduit cette matière colorante de telle sorte que la couleur rouge rubis du milieu, passe au jaune canari avec fluorescence verte.

C'est en 1898 que ROTHBERGER (47) a attiré l'attention sur cette nouvelle méthode de recherche du *colibacille*, en publiant les résultats qu'il a obtenus en cultivant ce microbe sur un milieu de gélose colorée au rouge neutre.

HELLER, pour rendre le milieu plus transparent, remplace la gélose par la gélatine.

En 1900, SCHEFFLÈR (51) confirme les résultats de ROTHBERGER; mais au lieu de gélose simple il se sert de gélose glycécinée.

En 1903, WOLF (61), en étudiant la gélose au rouge neutre, démontre que l'action de l'oxygène contrarie la réduction du rouge neutre et par là-même la fluorescence et la teinte jaune canari.

En 1904, OLDEKOP (35) propose l'addition de

glucose. Le colibacille, faisant fermenter le glucose, produit des bulles gazeuses dans le milieu de culture.

La même année, STOKES (54) utilise le lactose à la place du glucose, pour différencier le colibacille des espèces virant le rouge neutre, mais ne faisaient pas virer le lactose.

Mais déjà, dès 1901, SAVAGE (43) et MARGILL avaient proposé simultanément l'emploi d'un milieu liquide au rouge neutre ; et la même année, SAVAGE, au LXIX^e Congrès de la *British. med. Association*, exposait les résultats obtenus par l'emploi d'un bouillon au rouge neutre, connu depuis sous le nom de *bouillon de Savage*.

Grâce à ce procédé, on était dès lors en possession d'un moyen permettant, à l'aide du rouge neutre, non seulement de différencier le *colibacille* en culture, mais encore de le déceler dans les eaux.

En 1902, GÉZES (20) étudie le procédé de Savage sur diverses espèces de *colibacilles*, de *bacilles d'Eberth*, et sur des mélanges de ces deux bactéries ; il fait cette remarque importante que la température n'influe pas sur la réaction du rouge neutre donnée par le *colibacille*.

En 1906, BRAUN (3) expose le résultat de recherches ayant pour but de déceler le colibacille dans les eaux de boisson et préconise, avec beaucoup d'insistance, le *bouillon de Savage*.

En 1907, LACOMME (29) perfectionne le procédé en portant le milieu à la température de 44°5 pour éliminer les germes qui ne peuvent végéter à cette température.

La même année, BRAUN confirme les résultats de LACOMME et suggère l'idée que l'on pourrait combiner le procédé de SAVAGE et celui d'EIJKMANN.

LACOMME combine alors ces deux procédés et, en 1910, publie le résultat de ses travaux, d'où il conclut que seuls les *colibacilles* typiques donnent la réaction : production de gaz et fluorescence.

En 1907, d'ailleurs, JAROMIR BULİR (25) avait déjà combiné pour déceler le colibacille : la production de gaz à 46 degrés avec la production d'acide et la réduction du rouge neutre.

En 1910, FABRE-DOMERGUE et LEGENDRE (12) recherchent le *colibacille* dans l'eau de mer et dans l'eau de divers mollusques marins ; ils montrent l'influence défavorable des sels de l'eau de mer sur la réaction du rouge neutre.

La même année, ces deux auteurs font connaître un nouveau procédé de recherche du *colibacille* en culture anaérobie à l'aide d'un bouillon phéniqué au rouge neutre. L'année suivante ils perfectionnent leur technique.

En 1910, ROCHAIX et DUFOURT (42) publient un travail tentant à démontrer que la réaction du rouge neutre est l'apanage des microbes de la fermentation ammoniacale, et montrent la nécessité de la production d'ammoniaque libre dans les cultures pour que la réaction puisse s'opérer.

L'année suivante, GUERBET (19) complète la connaissance du mécanisme de la réaction du neutral-rot en montrant l'importance des phénomènes de réduction. Il apporte en outre des résultats sur le rôle des

sucres et de l'oxygène dans la production de la réaction.

En 1914, ROCHAIX (44) confirme les conclusions de GUERBET en ce qui concerne le rôle de l'oxygène et montre que les bouillons non sucrés décèlent de façon constante la présence du colibacille.

Après ce rapide exposé historique de la méthode au neutral-rot, nous allons maintenant indiquer le mode opératoire, tel qu'il est utilisé dans la plupart des laboratoires.

Le milieu au rouge neutre le plus couramment employé pour la recherche du *colibacille* dans les eaux de boisson est le *bouillon de Savage*.

Voici sa préparation :

On place 125 grammes de viande de bœuf finement hachée dans un demi-litre d'eau. On porte à l'ébullition et on laisse cuire pendant une heure.

Après refroidissement, on ajoute :

Peptone Defresne . . .	10 grammes
Sel marin	10 —
Glucose	2 gr. 50

On ramène ensuite à 500 centimètres cubes avec de l'eau distillée. On laisse refroidir, reposer et on décante soigneusement. Puis on ajoute 5 centimètres cubes de la solution suivante :

Rouge neutre. . . .	5 grammes
Eau.	100 centimètres cubes

et on porte à l'autoclave à 115 degrés pendant trente minutes.

On répartit ce bouillon dans différents tubes et on y ajoute l'eau à analyser dans des proportions variant de 20 à 200 p. 100.

Ensuite on met à l'étuve à 37 degrés.

Au bout de quarante-huit heures, si l'on a affaire à du *colibacille*, le milieu prend une belle teinte jaune canari avec fluorescence.

CHAPITRE III

APPLICATION A LA RECHERCHE DU COLIBACILLE DANS LES EAUX — CAUSES D'ERREURS

BRAUN (3) a étudié tout spécialement l'application du procédé de Savage à la recherche du colibacille dans les eaux et, en 1906, a apporté le résultat de ses recherches ayant duré deux ans.

Il ensemence avec, respectivement, 1 et 10 centimètres cubes de l'eau soumise à l'analyse, deux tubes renfermant 6 centimètres cubes de bouillon de Savage. Il met à l'étuve. Au bout de vingt-quatre heures, il se forme des bulles gazeuses et, suivant la quantité de colis, le milieu devient fluorescent ou jaune canari.

Si la coloration reste la même après quarante-huit heures, on peut conclure qu'il n'y a pas de colibacille.

De son expérience, il se croit en droit de conclure :

1° LA RÉACTION EST CONSTANTE. — Dans de nombreux échantillons d'eau ayant donné la réaction du rouge neutre, il a pu déceler chaque fois le colibacille par les procédés classiques : gélose glucosée, bouillon phéniqué, petit lait, tournesolé, etc.

Une seule fois il a obtenu la réaction et n'a pu déceler le colibacille.

2° LA RÉACTION EST RAPIDE. — La teinte jaune canari s'obtient après vingt-quatre heures et, au plus tard, après quarante-huit heures d'étuve.

3° LA RÉACTION EST SPÉCIFIQUE. — Il a expérimenté les germes les plus variés : différentes variétés de cocci, le *bacille de Lœffler*, toutes les races de *bacilles dysentériques*, le *bacille pyocyanique*, le *pneumobacille de Friedländer*, différentes races de *bacilles d'Eberth*, toutes les variétés de *bacilles paratyphiques*, un grand nombre de germes isolés des eaux.

La coloration fluorescente ou jaune canari du bouillon n'aurait été obtenue que par l'ensemencement de *colibacille*.

BRAUN (3) se croit donc en droit de conclure que l'on peut interpréter la réaction comme indice de la présence du coli.

Cependant cette dernière conclusion n'est peut-être pas à l'abri de tout reproche.

Nous verrons, en effet, plus loin que de nombreuses causes peuvent induire en erreur dans l'interprétation des résultats et que tous les auteurs ne partagent pas la manière de voir de BRAUN.

4° LA RÉACTION EST TRÈS SENSIBLE. — Les expériences suivantes le démontrent :

a) 100 centimètres cubes d'eau stérile sont souillés

avec l'extrême pointe d'un fil de platine trempée dans un bouillon de culture de coli. BRAUN ensemence 1 centimètre cube de cette eau dans un bouillon au rouge neutre. Après vingt-quatre heures d'étuve, réaction positive jaune canari ;

b) Même réaction positive avec 1 litre d'eau stérile ;

c) Même résultat positif avec 2 litres d'eau stérile ;

d) Réaction toujours positive en diluant à 1/10 la solution précédente. Le résultat a été négatif avec les dilutions à 1 pour 100 et 1 pour 1.000.

5° LA RÉACTION PEUT ÊTRE UTILISÉE POUR LA RECHERCHE QUANTITATIVE DU COLIBACILLE. — Pour cela, on ensemence avec une petite pipette de L gouttes au centimètre cube un certain nombre de tubes de bouillon au rouge neutre avec des doses variables d'eau suspectée (I, V, X, XX, XXX, XL, L gouttes, par exemple).

Si, après vingt-quatre heures d'étuve, le tube qui renferme I goutte donne la réaction, on admettra qu'il y a 50 germes de coli au centimètre cube.

Si le tube qui a L gouttes donne seul la réaction, on pourra dire que l'eau renferme 1 coli par centimètre cube.

Il serait donc possible, par un simple procédé calorimétrique, de déterminer en vingt-quatre heures la présence du coli dans une eau et d'avoir une idée de sa teneur en germes.

On pourrait alors diriger ses recherches immédiatement du côté du bacille d'Eberth ; et c'est après avoir

obtenu, à l'aide de ces analyses sommaires, des résultats très nets et très encourageants, au point de vue de la prophylaxie de la fièvre typhoïde, que BRAUN recommande la méthode du rouge neutre pour la recherche rapide des souillures fécales dans l'eau de boisson.

* * *

Malheureusement tous les auteurs ne sont pas du même avis que BRAUN en ce qui concerne la valeur de cette méthode qui, à vrai dire, n'est pas exempte de quelques inconvénients pouvant amener des causes d'erreurs capables de fausser assez gravement le résultat des analyses.

Déjà en 1898, ROTHBERGER (47), le promoteur de la méthode avait remarqué que le *bacille de Nicolaïer* et celui de l'*œdème malin* pouvaient donner la fluorescence.

SCHEFFLER (51), en 1900, a retiré des matières fécales huit variétés de germe et des eaux trois variétés pouvant rendre fluorescent le milieu au rouge neutre.

HUNTER, en 1901, publie que le *B. enteritidis*, le *bacille tétanique* et le *bacille du charbon* font virer le rouge neutre.

SEGALE, en 1908, constate que l'acidité produite par le *colibacille* dans la fermentation des sucres contraire la réaction. De plus, il constate que certains *paratyphiques* font virer le rouge neutre.

ROCHAIX (43), en 1909, expose que le *Bacillus subtilis* donne une fluorescence, mais sans changement

de teinte du milieu. La présence très fréquente du *Bacillus subtilis* dans les eaux de boisson de notre région, fait que cette cause d'erreur doit être particulièrement évitée. La règle suivante le permet facilement ;

S'il y a un virage au jaune canari, l'erreur ne peut être faite (le *Bacillus subtilis* ne faisant pas virer complètement le neutral-rot).

S'il y a fluorescence verte, il faut distinguer trois cas :

S'il n'y a pas de voile à la surface et si le milieu est trouble, on peut conclure à du coli ;

S'il y a un voile à la surface et si le liquide est clair, on peut conclure à du subtilis.

Enfin, s'il y a un voile et que le milieu soit trouble, on ne peut conclure à la présence du coli qu'en recherchant les autres réactions de ce dernier microbe.

SICRE (52), en 1909 également, donne une liste de microbes faisant virer le rouge neutre. Ce sont : le *B. de Schottmuller*, le *B. de Gaertner*, le *B. fluorescens*, le *B. subtilis*, le *Micrococcus versicolor*, etc. Il aurait de plus constaté que certaines races de colibacilles perdent leur vitalité à 46 degrés et que des thermophiles peuvent agir énergiquement sur les sucres.

VINCENT (60), toujours en 1909, critique vivement la méthode au rouge neutre et avance que le *Proteus vulgaris*, le *B. megaterium*, le *B. pyocyaneus*, et diverses bactéries de la putréfaction poussent bien à 38 degrés et peuvent gêner le colibacille dans son action sur le rouge neutre. Confirmant les conclusions de SICRE, il constate que dans 5 pour 100 des cas, des bactéries banales des eaux font virer le rouge neutre.

FABRE-DOMERGUE et R. LEGENDRE (12), en 1910 et

1911, étudient une question très intéressante. C'est la recherche du colibacille dans l'eau de mer, dans les huîtres et autres coquillages marins. Ils démontrent, par une série d'expériences, que l'eau de mer ralentit et diminue les cultures de colibacille, à tel point que les procédés les plus recommandés, entre autres le bouillon de peptone glucosé au rouge neutre, perdent la sensibilité et la rapidité qui les rendaient utiles.

ROCHAIX et DUFOUT, (42) en 1911, ont isolé de diverses urines et du purin six bacilles et deux microcoques qui donnent à la fois le virage au jaune canari et la fluorescence verte.

GUERBET (19) montre que l'oxygène de l'air a une fâcheuse influence sur la production de la fluorescence. On le comprend d'ailleurs très bien depuis que l'on connaît le mécanisme de la réaction.

ROCHAIX (44) déduit de nombreuses expériences que les races colibacillaires produisant une forte proportion d'acide dans l'attaque des sucres empêchent le virage.

Les causes pouvant masquer ou faire disparaître la réaction du rouge neutre dans le *bouillon de Savage*, ou encore celles pouvant la faire apparaître lorsque le coli est absent, sont donc nombreuses.

Aussi pour donner plus de précision à cette méthode a-t-on cherché à la combiner avec d'autres, ainsi que nous l'avons rapidement indiqué dans l'historique. Mais nous allons maintenant étudier avec un peu plus de détails ces différents perfectionnements et examiner s'ils sont exempts des divers inconvénients que l'on a pu reprocher à la méthode primitive.

CHAPITRE IV

COMBINAISON AVEC D'AUTRES MÉTHODES

Nous avons vu, au chapitre précédent, les causes d'erreurs de la méthode de SAVAGE; nous allons maintenant examiner plusieurs procédés qui, en se combinant avec elle, permettent d'en tirer un meilleur parti.

En 1907, LACOMME (28) utilisant en même temps la méthode de SAVAGE et celle de RODET, ensemence des microbes aquatiles sur milieu au rouge neutre, et porte à la température de 44°5, pour éliminer les germes qui ne peuvent végéter à cette température. Cette pratique est devenue courante dans les laboratoires.

De ces expériences il conclut qu'aucun microbe autre que le coli ne produit de fluorescence, à condition d'examiner immédiatement après vingt-quatre heures. Il fait cependant cette restriction que des colis authentiques peuvent peut-être ne pas virer le rouge neutre.

Poursuivant ces recherches, ce même auteur, sur les indications de BRAUN, combine le procédé de Savage et celui d'Eijkmann de la façon suivante :

Il fait la solution :

Peptone . . .	100 grammes
Glucose . . .	100 —
Sel marin. . .	50 —
Rouge neutre. .	3 gr. 50
Eau.	1.000 centimètres cubes

Il introduit, dans des tubes d'Eijkmann, 15 centimètres cubes de cette solution, avec 100 centimètres cubes d'eauensemencée avec divers microbes et constate que seuls les colibacilles typiques donnèrent, en vingt-quatre heures, production de gaz et fluorescence à la température de 45 degrés.

En 1907, JAROMIR BULİR (25) combine pour la recherche du colibacille la formation de gaz à 46 degrés, la formation d'acide et la réduction du rouge neutre.

Il opère ainsi :

Il fait macérer, pendant vingt-quatre heures, 1 kilogramme de bœuf finement haché, dans deux litres d'eau. Il prend 1 litre de cet extrait, le filtre et y ajoute :

Peptone de Witte . . .	25 grammes
Sel marin	15 —
Mannite	30 —

Après cuisson, pendant une heure et demie, il neutralise à la sonde et stérilise pendant deux heures à la vapeur.

Il mélange ensuite 100 centimètres cubes de l'eau à

analyser, 50 centimètres cubes de bouillon et 2 gr. 50 d'une solution de rouge neutre à 1 pour 100 dans l'eau distillée.

Il répartit dans les tubes d'Eijkmann et porte à l'étuve à 46 degrés.

Pour que la réaction soit positive, il faut qu'il y ait : *fluorescence*, *production de gaz* et *acidité du milieu de culture*.

SICRE (52), en 1909, combine la méthode de SAVAGE et celle de CHANTEMESSE et WIDAL en faisant un bouillon de Savage phéniqué. Il en aurait obtenu de très bons résultats.

LACOMME (28), en 1910, publie le résultat de nouvelles recherches :

La formule de bouillon est la même qu'en 1907, mais il n'ajoute le rouge neutre que postérieurement pour éviter son altération.

Il mélange 100 centimètres cubes de l'eau à analyser avec 15 centimètres cubes de son bouillon glucosé peptoné et ajoute X gouttes d'une solution de rouge neutre saturée à chaud, filtrée et stérilisée.

Il répartit dans des tubes d'Eijkmann, portés à l'étuve à 45-46 degrés.

Il a expérimenté avec des *colibacilles* qui lui ont toujours donné de la *fluorescence* et des *gaz*.

Il a expérimenté avec des cultures pures des microbes suivants :

B. pyocyannique ;

B. cinnabareus ;

B. Schottmuller ;

B. Gærtner ;
B. megaterium K. ;
B. proteus vulgaris ;
B. mesentericus ;
B. subtilis.

Il n'a obtenu *aucune réaction*.

Dans une troisième série d'expériences, il a expérimenté sur des mélanges de différents microbes.

Le mélange : *B. pyocyannique*, *B. mesentericus fuseus*, *B. proteus vulgaris*, *B. de Schottmuller*, a donné de la *fluorescence*, mais *pas de gaz*.

Le mélange : *B. mesentericus vulgatus*, *B. megaterium* K., *B. proteus vulgaris*, *B. de Gærtner*, *B. subtilis*, *B. pyocyannique*, *B. fluorescens non liquefaciens* n'a donné *aucune réaction*.

Par contre, si à chacun de ces deux mélanges il ajoutait des cultures de coli, la réaction apparaissait.

Il se croit donc en droit de conclure que la réaction *gaz-fluorescence*, en ce qui concerne le *colibacille* :

- 1° Est *constante* ;
- 2° Est *rapide* ;
- 3° Peut être considérée comme *spécifique* ;
- 4° Est *extrêmement sensible*.

La combinaison des méthodes au neutral-rot et d'Eijkmann serait donc susceptible de permettre la recherche rapide du colibacille dans les eaux de boisson.

Tous les colibacilles ne sont peut-être pas décela-

bles par cette méthode, mais on peut toutefois considérer tous les germes produisant la réaction comme des colibacilles ou tout au moins comme des germes tellement voisins qu'ils indiquent sûrement une pollution d'origine fécale.

Nous venons de voir que certains colibacilles peuvent ne pas être décelés par cette méthode. Pourquoi ? C'est la question que nous allons tâcher d'élucider dans les chapitres suivants.

CHAPITRE V

MÉCANISME DE LA RÉACTION

Le rouge neutre, très employé en teinture, est, comme on sait, un *chlorhydrate de diméthyldiaminotoluphénazine symétrique*, répondant à la formule :



Ce corps, soluble dans l'eau, lui communique une coloration rouge rubis.

Sous l'influence des alcalis, de l'ammoniaque en particulier, la base du rouge neutre est mise en liberté. Cette substance donne une coloration jaune orangé en solution aqueuse.

Si l'on fait agir sur le « neutral-rot » des réducteurs, tels que l'hydrogène naissant, en solution *acide*, le liquide devient rouge groseille, en même temps qu'apparaît une légère fluorescence verte, visible par réflexion.

En solution *alcaline*, les réducteurs transforment

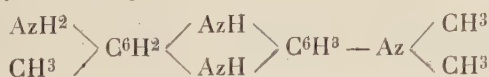
le rouge neutre en son hydrobase¹ par rupture du noyau azoté de la phénarine ; le corps obtenu donne, en solution aqueuse, une coloration jaune serin par transparence, avec fluorescence verte par réflexion.

Il est d'ailleurs facile de produire cette réaction : on place dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'eau, additionnée de X gouttes de solution de rouge neutre à 25 pour 100. On ajoute quelques parcelles de limaille de zinc et une dizaine de gouttes d'acide acétique ou lactique. Ce mélange est légèrement chauffé : un dégagement d'hydrogène apparaît. En continuant à chauffer, le dégagement devient régulier et abondant ; la coloration rouge, légèrement violacé, qu'a prise le neutral-rot sous l'influence de l'acidification, passe au rouge rubis, puis au rouge brique. On voit, en même temps, apparaître une *fluorescence verte*, qui va s'accroissant au fur et à mesure que la réduction se produit.

Sous l'influence de la réduction, un des deux éléments de la réaction, la fluorescence verte, a apparu. A ce moment, on décante la liqueur pour la séparer du zinc et on ajoute, goutte à goutte, un alcali, ammoniacal ou potasse. La teinte rouge brique fait place à une teinte orangée, puis à une teinte *jaune canari*, quand l'alcali est en excès.

En même temps, la fluorescence augmente jusqu'à ce que l'excès d'alcali dissolve le précipité gélatineux

¹ Cette hydrobase répond à la formule suivante :



d'oxyde de zinc. La fluorescence est exagérée par la présence du précipité gélatineux¹.

La réaction est alors complète : coloration jaune canari par transparence, avec fluorescence verte par réflexion.

Elle est due, comme on l'a vu, à la réduction du rouge neutre en milieu alcalin.

Dans les cultures de colibacille en bouillon au rouge neutre, le mécanisme est le même.

1° FLUORESCENCE VERTE. — La réduction du rouge neutre par le colibacille est certaine. Nous n'avons pas à étudier ici le pouvoir réducteur de ce microorganisme, qu'il nous suffise de rappeler qu'il est capable de réduire un très grand nombre de substances.

CASSEDEBAT (6) obtient la décoloration de la chrysoïdine, de la fuchsine, du vert brillant, du violet de gentiane, du bleu de méthylène, WURST (62) du tournesol. ELSNER (11) étudie son pouvoir réducteur sur un milieu de pommes de terre avec l'hydroquinone. CAPALDI et PROSKAUER (4) utilisent le molybdate d'ammoniaque. SMITH (53) reprend l'étude de la décoloration du tournesol et du bleu de méthylène. WOLF (52) étudie l'action du colibacille sur l'oscéine. SCARZELLA (50) utilise plus de trente-quatre matières colorantes. Puis ce sont les travaux de BUCHHOLZ (4), avec l'orseille, de GUTH (22) avec l'alizarine, de FREGONNEAU (4) avec le méthyl-orange, LIPPENS (33)

¹ Dans les cultures, la présence des bactéries joue le rôle du précipité, en augmentant la fluorescence.

avec l'hémoglobine, de WICHERN (63) avec le bleu de méthylène.

Le colibacille réduit le rouge neutre au même titre que les substances précédentes. Mais il possède vis-à-vis de cette substance une affinité particulière, alors que beaucoup d'autres bactéries, cependant réductrices, restent sans action sur elle.

D'ailleurs, la fluorescence dans les cultures aérobies, disparaît assez rapidement, l'oxygène de l'air agissant sur la matière colorante, alors que dans les cultures anaérobies, la réaction persiste très longtemps. Cette dernière observation confirme donc le rôle du phénomène de réduction dans la production du virage des cultures de colibacille en bouillon au neutral-rot.

2° COLORATION JAUNE CANARI. — C'est sous l'influence de l'alcalinité, due à l'apparition d'ammoniaque dans les cultures, que le rouge neutre passe au jaune canari, comme l'ont montré ROCHAIX et DUFOURT (42).

Cependant cette condition n'est pas suffisante ; il faut, pour obtenir le virage complet, l'intervention de phénomènes réducteurs, ainsi que l'a indiqué GUERBET (19.) Sous l'influence de l'alcalinité seule, on n'obtient souvent qu'une coloration jaune brique.

L'intervention du pouvoir réducteur du bacille est démontrée par les faits suivants :

1° On sait que la réaction du rouge neutre en aérobie, même quand elle s'est présentée avec toute sa netteté, disparaît assez rapidement. La fluorescence disparaît d'abord ; cette disparition indique que les

processus de réduction sont terminés et que l'oxygène de l'air influe sur la matière colorante. En même temps que la fluorescence s'atténue, la coloration jaune canari tend à virer au jaune rougeâtre. Dans une culture de coli vieille de huit jours, il ne reste plus qu'une coloration pelure d'oignon. Cependant, au début de la culture, le virage jaune canari s'est produit alors qu'il n'y avait pas d'ammoniaque libre en apparence dans la culture (il s'en forme cependant des traces qui sont suffisantes pour aider les phénomènes de réduction); d'autre part, la teinte jaune disparaît, malgré les proportions croissantes d'ammoniaque, en même temps que le pouvoir réducteur des bactéries s'atténue.

2° Prenons une culture anaérobie (de trois jours) de colibacille, ouvrons le tube et agitons-le à l'air; en l'espace de quelques minutes, sous l'influence de l'oxygène de l'air, la fluorescence disparaît et la teinte jaune canari fait place à une teinte jaune rougeâtre; c'est cette teinte rougeâtre qui correspond à l'action de l'ammoniaque seule sur le rouge neutre.

Quelle est l'origine de l'ammoniaque ?

A. ROCHAIX et DUFOURT (42), au cours de recherches sur les urobactéries, ayant reconnu que ces microorganismes agissent sur le rouge neutre, ont pensé qu'il pourrait y avoir une relation entre cette action et la fermentation ammoniacale. On sait, depuis HALLÉ et DISSART (23), que le colibacille est capable de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque.

Plusieurs faits, d'après ces auteurs, paraissent montrer les relations qui unissent les deux propriétés :

1° En faisant varier le pouvoir de faire fermenter l'urée, on observe des variations parallèles dans le pouvoir de faire virer le neutral-rot. Des cultures qui, par une série de générations artificielles, perdent leurs propriétés fermentatives, voient également disparaître leur pouvoir de faire virer le neutral-rot. Lorsque, en reprenant ces cultures, on les excite par des passages successifs sur divers milieux appropriés, comme de l'urine par exemple, ou par des passages sur des animaux, on voit qu'elles récupèrent les unes assez vite, les autres plus difficilement, et leur pouvoir sur l'urée et leur action sur le neutral-rot. Il y a une constance presque absolue et réciproque dans l'exaltation et la disparition de ces deux propriétés.

2° Dans certaines circonstances exceptionnelles, il est arrivé aux deux auteurs précités de voir certaines cultures non récentes, mais n'ayant pas cependant séjourné pendant très longtemps au laboratoire, ne pas donner lieu au virage connu, lorsqu'on les ensemençait dans le bouillon de Savage. Ils ont pu faire réapparaître cette propriété en additionnant la culture d'une petite quantité d'urée.

ROCHAIX et DUFOUT (42) ont tiré de ces faits la conclusion que la réaction du neutral-rot est spécifique du groupe des microbes qui transforment l'urée en carbonate d'ammoniaque, comme nous l'avons indiqué ailleurs.

Ils ont conclu, en outre, que ces faits pouvaient éclaircir le mécanisme intime de la réaction du neutral-rot.

On sait que les microbes, comme d'ailleurs tous les

tissus vivants, déterminent, par leurs réactions vitales, la production d'urée.

Or, il est probable que les microbes de la fermentation ammoniacale, qui, seuls, sont capables de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque, soit aussi les seuls à transformer ultérieurement dans les cultures cette urée en composés ammoniacaux qui, par suite de réactions secondaires, donneraient momentanément de l'ammoniaque libre. L'ammoniaque, ainsi mis en liberté, agirait sur le neutral-rot, pour le faire virer au jaune.

GUERBET (19) soutient de son côté que la réaction du neutral-rot serait spécifique des bactéries ayant un pouvoir réducteur et capables de produire de l'ammoniaque, aux dépens de l'aliment azoté. Cette affirmation, comme le fait remarquer l'auteur lui-même, ne tendrait rien moins qu'à nier toute spécificité à la réaction du rouge neutre.

En effet, la plupart des microbes sont capables de phénomènes de réduction ; c'est une fonction générale de toutes les bactéries qui vivent dans la profondeur des milieux de cultures.

D'autre part, en dehors même des microbes de la fermentation ammoniacale, il en est un très grand nombre qui donnent de l'ammoniaque aux dépens des substances protéiques du milieu de culture.

Mais ce qui conserve à la réaction sa spécificité, c'est l'*affinité* du colibacille pour le neutral-rot, cas particulier de la règle générale d'affinité des espèces microbiennes pour telle ou telle matière réductible.

En somme, on peut dire que le virage au jaune canari avec fluorescence verte des bouillons au neutral-rot par les eaux colibacillifères est dû à la réduction du rouge neutre, en milieu alcalin. Cette alcalinité est due à l'ammoniaque libre produite dans la culture et dont l'origine est encore discutée.

CHAPITRE VI

ROLE DES SUCRES DANS LA RÉACTION

Divers auteurs ont préconisé les uns l'addition de glucose, les autres celle de lactose, d'autres enfin l'absence de sucre dans le but de favoriser la réaction du rouge neutre. Ils ont obtenu ainsi des résultats contradictoires.

Guerbet (19) s'est préoccupé de cette question et a fait quelques expériences en aérobie et en anaérobie d'où il résulte que l'acidité des cultures, c'est-à-dire la présence de sucres fermentescibles, est nuisible à la réaction en aérobie (voir mécanisme de la réaction, chap. V).

La présence des sucres, si elle permet de surprendre la formation des gaz dans les cultures, gêne considérablement le virage du milieu au jaune canari avec fluorescence verte.

Il est facile de le comprendre depuis que le mécanisme de la réaction du rouge neutre est connu : le virage et la fluorescence sont dus à un phénomène de réduction en milieu alcalin. Or, la fermentation des sucres aboutit à la production d'acides, le virage sera

donc forcément gêné s'il n'est pas totalement empêché. On risquera donc d'avoir des résultats négatifs alors que l'eau renferme du colibacille.

Pour vérifier le fait, nous avons pratiqué avec M. le Dr ROCHAIX une série de recherches du colibacille dans l'eau comparativement au milieu du neutral-rot sucré (glycose ou lactose) et en milieu non sucré (tableau I).

Le tableau I, p. 42, nous montre que le bouillon au neutral-rot, glycosé ou lactosé, est souvent en défaut, alors que les bouillons non sucrés décèlent de façon constante la présence du colibacille.

Si nous faisons abstraction des n^{os} 12, 14 et 21, où nous n'avons pas isolé de colibacille typique, nous trouvons que sur 43 échantillons d'eau, renfermant du colibacille, 27 fois seulement, c'est-à-dire dans la proportion de 62, 79 p. 100, le bouillon au neutral-rot sucré a donné la réaction positive, alors que le bouillon non sucré ne fut pas une seule fois en défaut. Les milieux phéniqués (milieux de Vincent) donnèrent une fois (eau n^o 18) une réaction négative alors que l'eau renfermait du colibacille.

D'autre part, le virage en bouillon au neutral-rot sucré est fugace; il apparaît pendant quelques heures et disparaît. Il est souvent incomplet et se réduit à la fluorescence sans production de la coloration jaune canari. Le virage en bouillon au neutral-rot sucré est au contraire persistant; il n'exige pas une surveillance de tous les instants pour surprendre le moment du virage. Cette différence s'explique très bien par le mécanisme de la réaction,

Tableau I

ECHANTILLON d'eau	BOUILLON au neutral-rot sucré	BOUILLON au neutral-rot non sucré	MILIEUX phéniqués (de Vincent)	ISOLEMENT et identification du colibacille ¹	Observations
Eau n° 1	+	+	+	+	
— 2	—	+	+	+	
— 3	—	+	+	+	
— 4	—	+	+	+	
— 5	+	+	+	+	
— 6	—	+	+	+	
— 7	+	+	+	+	
— 8	+	+	+	+	
— 9	+	+	+	+	
— 10	—	+	+	+	
— 11	—	+	+	+	
— 12	—	+	+	—	
— 13	+	+	+	+	
— 14	+	+	+	²	
— 15	+	+	+	+	² Bacille ayant toutes les réactions habituelles du colibacille mais n'attaquant pas les sucres.
— 16	—	+	+	+	
— 17	+	+	+	+	
— 18	+	+	—	+	
— 19	—	+	+	+	
— 20	+	+	+	+	
— 21	—	—	+	³	
— 22	—	+	+	+	³ Bacille ayant tous les caractères du coli. mais n'attaquant pas le lait et ne faisant virer le tournesol.
— 23	—	+	+	+	
— 24	+	+	+	+	
— 25	—	+	+	+	
— 26	—	+	+	+	
— 27	—	+	+	+	
— 28	+	+	+	+	
— 29	+	+	+	+	
— 30	+	+	+	+	
— 31	+	+	+	+	
— 32	+	+	+	+	
— 33	+	+	+	+	
— 34	+	+	+	+	
— 35	+	+	+	+	
— 36	—	+	+	+	
— 37	—	+	+	+	
— 38	+	+	+	+	
— 39	+	+	+	+	
— 40	+	+	+	+	
— 41	+	+	+	+	
— 42	+	+	+	+	
— 43	+	+	+	+	
— 44	—	+	+	+	
— 45	+	+	+	+	
— 46	+	+	+	+	

¹ Ont été considérés comme colibacilles, les bacilles ayant présenté les caractères suivants : colonies rouges sur milieu d'endo-mobilés, ne prenant pas le grain, faisant coaguler le lait, virer au rouge le bouillon lactosé, tournesolé ne liquéfiant pas la gélatine, donnant de l'endol (procédé de Salkowsky).

On peut, par contre, se demander si le milieu non sucré n'est pas trop sensible et si le rouge neutre, dans ce cas, ne se laisse pas trop facilement influencer par des microbes réducteurs autres que le colibacille. L'échantillon d'eau n° 12 en effet a donné une réaction positive, alors que nous n'avons pu isoler de colibacille de l'eau. Pour répondre à cette question nous avonsensemencé en bouillon au neutral-rot non sucré un grand nombre de microbes; seuls, des microbes de la fermentation ammoniacale, les *paratyphiques* *Aertryck*, *Kurth*, *Para-B.* (Rennes), *Para-B.* (Lyon), *Conradi*, *Schootmüller*, nous ont donné le virage complet. Le *Bacillus subtilis*, le *Mesentericus vulgaris*, le *Mesentericus niger* ont produit, dans les vingt-quatre heures, un peu de fluorescence. Les autres microbes, pathogènes ou saprophytes, ensemencés (environ une soixantaine) n'ont donné ni fluorescence, ni virage au jaune canari.



Pourquoi certaines eaux colibacillifères font-elles virer le neutral-rot glycosé ou lactosé, alors que d'autres restent sans effet et ne font virer que le bouillon au neutral-rot non sucré?

Nous avons isolé des cultures en bouillon au neutral-rot sucré, un certain nombre de races de colibacilles dont nous avons étudié la fonction acidogène.

De l'échantillon n° 7, nous avons isolé cinq races de coli, pour les soumettre à cette étude (tableau II).

Tableau II

RACES de colibacilles	BOUILLON au neutral-rot glycosé	BOUILLON au neutral-rot non sucré	BOUILLON tournesolé- lacté	LAIT	OBSERVATIONS
Coli A	—	+	+	+	Résultats au bout de 48 h
Coli B	Virage complet au jaune canari avec fluores- cence.	+	—	—	
Coli C	Fluorescence. Pas de virage au jaune canari.	+	+	—	
Coli D	Légère fluores- cence. Pas de virage au jaune canari.	+	+	—	
Coli E	—	+	+	+	

Nous avons isolé de l'eau n° 19 deux races de colibacilles (tableau III) :

Tableau III

RACES de Colibacilles	BOUILLON au neutral-rot glycosé	BOUILLON au neutral-rot non sucré	BOUILLON tournesolé- lactosé	LAIT	OBSERVATIONS
Coli A	—	+	+	+	Coagulation non complète
Coli B	—	+	+		

De l'eau n° 35 nous avons isolé huit races de coli (tableau IV) :

Tableau IV

RACES de colibacilles	BOUILLON au neutral-rot glycosé	BOUILLON au neutral-rot non sucré	BOUILLON lactosé tournesolé	LAIT	OBSER- VATIONS
Coli A	Fluorescence. Pas de virage au jaune canari.	+	+	+	
Coli B	Id.	+	+	+	
Coli C	Légère fluores- cence. Pas de virage au jaune canari.	+	+	Coagulation incomplète	
Coli D	Id.	+	+	Id.	
Coli E	Id.	+	+	—	
Coli F	Id.	+	+	—	
Coli G	Fluorescence Pas de virage au jaune canari.	+	+	—	

Les tableaux II, III et IV montrent d'une façon très nette que les colibacilles à fonction acidogène très accusée (coli A et E du tableau II, A et B du tableau III, A et B du tableau IV) ne font pas virer, ou seulement d'une façon très incomplète, le bouillon au neutral-rot sucré. Par contre, les colibacilles à fonction acidogène faible (coli D du tableau II; E et F du tableau IV) ou nulle (coli B du tableau II) font virer les bouillons sucrés.

Les bouillons au neutral-rot, non sucrés, ont viré dans tous les cas et ne sont pas influencés par la fonction acidogène des bacilles.

Si donc les eaux n° 7 (tableau II) et n° 35 (tableau IV) ont donné un résultat positif dans la recherche directe du colibacille dans l'eau (tableau I), c'est qu'elles renfermaient des colibacilles à fonction acidogène faible ou à peu près nulle : seules ces races colibacillaires ont été décelées ; les races de colibacilles à fonction acidogène accusée, renfermées également dans ces eaux, n'ont pas été décelées par le bouillon au neutral rot sucré.

■
* *

GUERBET (19) a montré qu'en présence du glycose, l'apparition de l'acidité est retardée par l'anaérobiose. On pourra donc, dans ce cas, utiliser comme élément de diagnostic la fermentation des sucres et le virage. De cette façon seulement, on pourra obtenir, à peu près certainement, le virage en même temps que la production de gaz. Mais si l'on pratique les cultures en aéro-biose, il est de toute nécessité de supprimer les sucres, qui gênent ou empêchent le virage.

*
* *

En somme, pour nous résumer, nous pouvons dire que :

1° La présence des sucres (glycose ou lactose) dans le bouillon de Savage gêne ou empêche le virage du bouillon au neutral-rot ou jaune canari avec fluorescence, lorsque l'eauensemencée dans ce bouillon contient du colibacille.

2° L'apparition ou l'absence de virage dans le

bouillon au neutral-rot est fonction de l'aptitude plus ou moins grande des colibacilles ensemencés, à attaquer les sucres et à produire des acides. Les races colibacillaires, produisant une forte proportion d'acide, empêchent le virage.

3° Pour les cultures aérobies, il vaut mieux supprimer les sucres et se contenter, comme élément de diagnostic, du virage au jaune canari avec fluorescence, qui dans ce cas sera complet et persistant. Si l'on veut toutefois utiliser les deux éléments de diagnostic (production de gaz par fermentation des sucres et virage au jaune canari avec fluorescence) il faut faire la culture en anaérobiose.

C'est ce point que nous allons maintenant étudier.

CHAPITRE VII

ROLE DE L'OXYGÈNE DANS LA RÉACTION MÉTHODES ANAÉROBIES

Nous avons vu au *Mécanisme de la réaction* chap. V, que l'un des facteurs du virage du neutral-rot était la propriété réductrice que possède le colibacille.

Mais cette propriété peut être contrariée par l'oxygène de l'air dans les cultures aérobies. En effet, en quelques minutes le rouge neutre viré et fluorescent prend une teinte rougeâtre si nous ouvrons un tube de culture et si nous l'agitons à l'air.

ROCHAIX et DUFOURT (42) ont d'ailleurs déjà constaté que le colibacille ne fait virer que le haut de la branche verticale des tubes d'Eijkmann, tandis que le *B. subtilis*, qui est un aérobie strict, ne fait virer que les couches superficielles.

Il fallait donc chercher à obtenir la réaction en l'absence de l'oxygène de l'air en ensemençant l'eau à analyser en cultures anaérobies.

Cela permettait, d'autre part, d'utiliser le glucose dans le milieu de culture (l'apparition de l'acidité venant de la fermentation du glucose étant retardée

par l'anaérobiose) et d'avoir ainsi un élément de plus de diagnostic (production de gaz).

GUERBET (19), d'une part, FABRE-DOMERGUE et R. LEGENDRE (13), d'autre part, se sont occupés de cette question et ont indiqué de nouveaux procédés pour la recherche du colibacille.

*
**

Voici la technique de GUERBET :

Dans 1 litre d'eau on fait dissoudre :

Extrait de viande . .	30 grammes
Peptone	50 —
Glucose.	50 —

On alcalinise légèrement à l'ébullition avec une solution de carbonate de soude ; on filtre, on ajoute :

Solution de rouge neutre à 0,25 pour 100, 70 centimètres cubes.

En principe, on met 40 centimètres cubes du bouillon de culture pour 100 centimètres cubes d'eau à analyser.

On distribue le milieu dans des tubes, dont la contenance variera avec la proportion d'eau sur laquelle on opère la recherche du colibacille.

GUERBET, dans ses recherches, utilise 50 centimètres cubes d'eau et emploie le dispositif suivant :

Dans un gros tube à essai de 0 m. 20 de long et 0 m. 028 de diamètre intérieur on dispose 20 centimètres cubes du milieu de culture, puis on y jette une petite cloche faite d'un tube à essai coupé (0 m. 040

de long et 0 m. 022 de diamètre intérieur), de telle manière que l'extrémité fermée regarde en haut. On bouche au coton et on passe à l'autoclave à 115 degrés pendant quinze minutes.

Pendant le séjour à l'autoclave, l'air de la cloche disparaît, de telle sorte qu'après refroidissement du milieu la cloche pleine de liquide est tombée au fond du tube.

50 centimètres cubes d'eau à analyser sont introduits avec une pipette plongeant au fond du tube, afin de faciliter le mélange des liquides même sous la cloche.

On verse ensuite à la surface du liquide 2 ou 3 centimètres cubes d'huile de lin stérile.

L'appareil est porté à l'étuve à 37 ou 40 degrés (il faut que la température soit au moins de 37 degrés); après seize ou vingt-quatre heures, rarement trente-six heures, si l'eau renferme du colibacille on constate que la réaction du rouge neutre a eu lieu et que la cloche est remontée à la surface du liquide grâce aux gaz dégagés.

Si, après quarante-huit heures, on n'a pas obtenu *à la fois* le virage du rouge neutre avec fluorescence et le dégagement de gaz, on peut conclure que l'eau ne renferme pas de colibacille.

Ce procédé possède de réels avantages. Il n'est pas compliqué, est très facile à mettre en œuvre, est très rapide et, d'après GUERBET, est très sûr.

Il favorise la réaction du rouge neutre et permet de rechercher, avec autant de certitude que possible, le colibacille dans les eaux potables.

La méthode qu'ont préconisée FABRE-DOMERGUE et R. LEGENDRE est un peu plus compliquée. Elle exige un matériel spécial, mais, par contre, elle a l'avantage de réunir la plupart des procédés d'isolement et de caractérisation préconisés pour la recherche du colibacille : température élevée, culture en milieu phéniqué, culture en milieu glucosé, culture au rouge neutre et, enfin, anaérobiose.

Voici cette méthode :

Le matériel se compose de deux tubes, l'un (le tube à culture) contenu dans l'autre. Le tube à culture remplit presque entièrement son enveloppe et se trouve arrêté, à une certaine distance du fond, par un étranglement limitant un réservoir inférieur où l'on place un mélange absorbant l'oxygène.

Les auteurs obturaient primitivement le tube extérieur par un bouchon en caoutchouc. Ils l'ont remplacé depuis, d'abord par une plaque de verre rodée et scellée, puis, plus simplement, par une fermeture de canette à bière.

Il en résulte donc une atmosphère très limitée, dont tout l'oxygène s'extraît sûrement en même temps que la dépression produite facilite le dégagement des gaz dans le milieu de culture.

La composition du milieu de culture est la suivante :

On prépare un bouillon très nutritif de chair et d'intestin de bœuf peptoné à 2 pour 100 et glycosé à 1 pour 100. Ce bouillon est réparti par doses de 30 centimètres cubes dans des tubes de 20 centimètres de long et de 2 centimètres de large, bouchés assez lâchement à l'ouate et stérilisés à 110 degrés

pendant quinze minutes. Après refroidissement, on additionne les tubes de XV gouttes d'une solution de rouge neutre à 0,50 pour 100, phéniquée à 5 pour 100, en agitant avec une fine baguette de verre stérilisée. Au moment de l'emploi, on ajoute la quantité voulue de l'eau à analyser.

Le mélange absorbant, placé dans le réservoir inférieur du tube extérieur, est un mélange d'acide pyrogallique et de potasse que l'on emploie de la façon suivante : on prépare une solution d'acide pyrogallique à 10 pour 100, préservée de l'oxydation par 5 centimètres cubes d'acide phénique à 5 pour 100. Au moment d'introduire le tube de culture, ensemencé dans son enveloppe, on verse dans celle-ci 10 centimètres cubes de la solution pyrogallique, puis on y fait tomber 5 ou 6 pastilles de potasse caustique.

L'absorption de l'oxygène commence assez tardivement, si l'on n'agit pas, pour laisser tout le temps nécessaire à l'introduction du tube de culture et à sa fermeture avant la réaction utile.

On porte ensuite à l'étuve à 41-42 degrés. Il est prudent de ne pas laisser dépasser 42 degrés et même de se tenir en deçà de cette température, car la réaction du rouge neutre cesse en milieu phéniqué lorsque l'on dépasse cette température.

Au bout de vingt-quatre heures, on obtient un virage du rouge neutre très net, une fluorescence, une production de mousse à la surface, une culture homogène, des ondes soyeuses dans le liquide, si l'eau à analyser est colibacillifère.

Il y a lieu cependant de faire remarquer, ainsi que

MIQUEL l'avait d'ailleurs déjà signalé, qu'il peut se produire quelquefois des cultures pures de *Streptococcus pyogenes* qui vont gêner ou masquer la réaction. FABRE-DOMERGUE et LEGENDRE ont d'ailleurs rencontré, eux aussi, un streptocoque voisin du *S. pyogenes*.

Aussi dans les cas douteux faudra-t-il faire un réensemencement dans le même milieu.

A part cette remarque, la méthode paraît sûre et extrêmement sensible. D'ailleurs, ses deux promoteurs l'ont utilisée pour la recherche du colibacille dans les huîtres et en ont obtenu les meilleurs résultats.

Pour la recherche dans les huîtres, au lieu de l'eau à analyser on emploie le liquide retiré d'une huître et comprenant l'eau de sa coquille et le liquide résultant de la dilacération de son intestin.

La méthode anaérobie, pour la recherche du colibacille en milieu au rouge neutre, est donc, actuellement, celle à qui l'on s'adressera, car c'est elle qui, grâce à la connaissance du mécanisme de la réaction, permet d'éviter les principales causes d'erreur.

CONCLUSIONS

I. — La méthode au neutral-rot a pris rang, depuis quelques années, parmi les moyens de recherche rapide du colibacille dans l'eau de boisson.

II. — De l'eau colibacillifère ensemencée en bouillon au neutral-rot, mise à l'étuve à 44°5, donne dans les 24 heures (36 ou 48 au plus tard) un virage au jaune canari avec fluorescence verte.

III. — Un certain nombre de microbes sont capables de donner la réaction sans être cependant des colibacilles (le bacillus subtilis en particulier).

IV. — Pour éviter autant que possible ces erreurs, quelques auteurs, LACOMME en particulier, ont proposé de combiner la méthode d'Eijkmann avec celle du neutral-rot.

V. — La réaction est due à la réduction du rouge neutre en milieu alcalin (ammoniaque).

VI. — Les sucres gênent la réaction. Il est donc

préférable de les supprimer dans la composition du milieu, contrairement à ce qui s'est fait jusqu'ici.

VII. — Il en est de même de la présence de l'oxygène de l'air. Aussi est-il préférable de faire les cultures en anaérobie, comme l'ont proposé FABRE-DOMERGUE et LEGENDRE.

VIII. — En se plaçant dans toutes les conditions énumérées, on réduira au minimum le nombre des erreurs.

Malgré tout, on ne devra jamais affirmer la présence du colibacille dans l'eau, sans l'avoir isolé, et en avoir établi les caractères cultureux, bio-chimiques et les caractères de coloration.

Vu :
LE DOYEN,
L. HUGOUNENQ.

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
Ch. LESIEUR.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 8 juillet 1914.
LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ
P. JOUBIN.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABBA, Ueber ein Verfahren den *Bacillus coli communis* schnell und sicher aus dem Wasser zu isolieren (*Centralblatt für Bak. Origin.*, Bd. XIX, S. 13).
2. BORNAND, Quelques recherches sur l'isolement de *Bacterium coli* dans les eaux par le procédé d'Eijkmann (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1913, p. 1025).
3. BRAUN, Le rouge neutre et le diagnostic de la souillure des eaux de boisson par le colibacille (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. IV, n° 13).
4. BUCHHOLZ, Zur kulturellen Unterscheidung der Typhus, Paratyphus, Colibakterien untereinander (*Zeitsch. für Hygiene*, Bd. LVI, S. 220).
5. CAPALDI et PROSKAUER, Beiträge zur Kenntniss der Läurelbildung bei Typhusbacillen und *Bacterium coli* (*Zeitsch. für Hyg.*, Bd. XXIII, S. 452).
6. CASSEDEBAT, le Bacille d'Eberth-Gaffky et les bacilles pseudo-typhiques dans les eaux de rivière (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, p. 625).
7. CHICH, The distribution of the *Bacterium coli commune* (*The Thompson Yales Laboratories, Report Liverpool*, III).
8. CHRISTIAN, Zum Nachweis fäkaler Verunreinigung von Trinkwasser (*Arch. für Hyg.*, Bd. LIV, S. 386).
9. COURMONT, *Précis de Bactériologie*, 4^e édit., Paris, O. Doin, édit., 1911.
10. EIJKMANN, Die gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasser-untersuchung (*Centralblatt für Bakt. Orig.*, Bd. XXXVII, S. 742).
11. ELSNER, Untersuchungen ueber electives Wachsthum der *Bacterium coli*-Arten und des Typhusbacillus und dessen diagnostische Verwerbarkeit. (*Zeitsch. für Hyg.*, Bd. XXI, p. 25).

12. FABRE-DOMERGUE et LEGENDRE (R.), Recherche du *Bacterium coli* dans l'eau de mer au moyen des méthodes employées pour l'eau douce (*Bulletin du Muséum d'Histoire naturelle*, 1910, p. 340).
13. — Note complémentaire sur le procédé de recherche du *Bacterium coli* en cultures anaérobies dans les eaux et dans les huîtres (*Bulletin du Muséum d'Histoire naturelle*, 1911, p. 38).
14. FREGONNEAU, Ueber die Wirkung von Bakterien auf Azofarbstoffe (*Central. für Bakt. Orig.*, Bd. XLIX, S. 276).
15. GAGE, A comparative study of media for the detection of *Bacillus coli* in drinking water (*Central. f. Bakt. Orig.*, Bd. XLVII, S. 280).
16. GAGE et STOUGHTON (Grace), Résistance du *Bacterium coli* à la chaleur (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 248).
17. GUEBET, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1911, p. 514.
18. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1911, p. 848.
19. — Contribution à l'étude des bacilles du groupe colityphique. Etude du pouvoir réducteur de ces bactéries (thèse de Paris, 1911).
20. GEZES, De la recherche du bacille d'Eberth dans les eaux de boisson (thèse de Lyon, 1902).
21. GRAZIANI, De l'emploi des phtaléines pour reconnaître le Colibacille, le bacille d'Eberth et celui du choléra (*Annales de Médecine expérimentale*, 1889).
22. GUTH, Zum Nachweis von Typhus und paratyphusbacterien (*Central. f. Bakt. Orig.*, Bd. LI, S. 190).
23. HALLÉ et DISSARD, Note sur la culture du *Bacillus coli* dans l'urine. Fermentation colibacillaire (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 18 mars 1903).
24. HENKE, Beitrag zur Verbreitung des *Bacterium coli* commune in der Aufsenwelt (*Central f. Bakt. Orig.*, Bd. XVI, S. 481).
25. JAROMIR BULIR, Bedeutung und Nachweiss des *Bacterium coli* im Wasser und eine neue Modifikation der Eijkmannschen Methode (*Arch. für Hyg.*, Bd. LXII).
26. KAISER, Ueber die Bedeutung des *Bacterium coli* im Brunnenwasser (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LII, S. 121).
27. KLOTZ et RACHIN, The reaction of various bacteria upon

- œsculin agar (*Journal of infections Diseases*, 1910, p. 67).
28. LACOMME, la Recherche rapide du coli-bacille dans les eaux de boisson par la méthode du neutral-rot combinée à celle d'Eijkmann (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1910, p 90).
29. — La recherche du coli-bacille dans les eaux de boisson par la méthode du neutral-rot (*Lyon médical*, 12 janvier 1908).
30. LESIEUR, Sur la valeur du procédé de Cambier (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, juillet 1902).
31. LÉVY et BRUNS, Zur Hygiene des Wassers (*Arch. f. Hyg.*, Bd. XXXVI, S. 178).
32. LIGNIER, Nouveau moyen d'isolement du coli-bacille (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1894, p. 200).
33. LIPPENS, Sur une réaction différentielle du *Bacterium coli* et du bacille typhique (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1909, t. I, p. 95).
34. NEUMANN, Der Nachweiss des *Bacterium coli* in der Außenwelt unter Zuhilfenahme der Eijkmanschen Methode (*Arch. f. Hyg.*, LIX, S. 174).
35. OLDEKOP, Eine Modifikation des Kolhberger-Schefflerschen Neutral-rot-nährbodens (*Central. f. Bakt. Orig.*, Bd. XXXV, S. 120).
36. PARIETTI, Metodo di ricerca del Bacillo del tifo nelle acque potabile (*Rivista d'Igiene e sanità pubblica*, 1890, n° 11).
37. PETRUSCKKY und PUSCH, *Bacterium coli* als Indikator für Fäkalverunreinigung von Wasser (*Zeits. f. Hyg.*, Bd. XLIII, S. 304).
38. PÉRÉ, Contribution à l'étude des eaux d'Alger (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 79).
39. ROCHAIX et DUFOURT, Contribution à l'étude des urobactéries (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 29 octobre 1910).
40. — Remarques sur la réaction du Neutral-rot (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 29 octobre 1910).
41. — Signification de la réaction au neutral-rot. Essai sur son mécanisme (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 5 novembre 1910).
42. — Contribution à l'étude des uro-bactéries et de la réaction du neutral-rot (application à l'analyse

- bactériologique des eaux) (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, janvier 1911).
43. ROCHAIX, Une nouvelle cause d'erreur dans la recherche du colibacille en milieux au neutral-rot (*Lyon médical*, 21 février 1909).
 44. — Présence des sucres dans les bouillons au neutral-rot (*Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*, 20 février 1914).
 45. RODET et ROUX, Bacille d'Eberth et *Bacillus coli*. Expériences comparatives sur quelques effets pathogènes (*Archives de Médecine expérimentale*, 1892, p. 317).
 46. RODET, Importance de la température dans la détermination du Bacille typhique (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 29 juin 1889).
 47. ROTHBERGER, Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährboden (*Central f. Bakt. Orig.*, Bd. XXIV, S. 513).
 48. ROUX et ROCHAIX, *Précis de Microbie et de Technique bactérioscopique*, 2^e édit., A. Maloine, édit., Paris, 1911.
 49. SAVAGE, Neutral red in the routine bacteriological examination of water (*British medical Journal*, 1901, July to Dec.).
 50. SCARZELLA, *Ann. Ig. Sperini*, 1904, p. 417.
 51. SCHEFFLER, Das Neutral-rot als Hilfsmittel zur Diagnose des *Bacterium coli* (*Central. f. Bakt.*, Bd. XXVIII, S. 199).
 52. SICRE, Au sujet du rouge neutre comme indice du colibacille (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXVI, p. 152).
 53. SMITH, *Centr. f. Bakt.*, Bd. XIX, S. 181.
 54. STOKES, *J. of infection Diseases*, 1904, p. 341.
 55. VALLET, *Le Bacterium coli dans ses rapports avec le bacille d'Eberth* (thèse de Lyon, 1892).
 56. VENEMA, Ueber eine Anreicherung von *Bacterium coli* im Wasser (*Central. f. Bakt. Orig.*, Bd. LX, S. 600).
 57. VINCENT, Sur un nouveau procédé d'isolement du bacille typhique dans l'eau (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1890, n° 5).
 58. — La Recherche du *Bacterium coli commune* dans les eaux (*Congrès international d'Hygiène*, Londres, 1891).

59. VINCENT, Sur la signification du *Bacterium coli* dans les eaux potables (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, p. 233).
60. — La détermination bactériologique du *Bacillus coli* dans l'eau de boisson (*Hygiène générale et appliquée*, février 1909).
61. WOLF, Zur Reduktionsfähigkeit der Bakterien (*Central. f. Bakt.*, Bd. XXVII, S. 849).
62. WURST, Note sur deux caractères différentiels entre le bacille d'Eberth et le *Bacterium coli commune* (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1891, p. 826).
63. WICHERN, Quantitative Untersuchungen über die Reduktionswirkung der Typhus-Coli-Gruppen (*Arch. f. Hyg.*, Bd. LXXII, S. 1).
-

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE PREMIER. — Introduction. — Revue générale des principaux procédés	9
CHAPITRE II. — Méthode au neutral-rot. — Principe. — Historique. — Manuel opératoire	16
CHAPITRE III. — Application à la recherche du colibacille dans les eaux. — Causes d'erreurs.	21
CHAPITRE IV. — Combinaison avec d'autres erreurs. . .	27
CHAPITRE V. — Mécanisme de la réaction	32
CHAPITRE VI. — Rôle des sucres dans la réaction . . .	40
CHAPITRE VII. — Rôle de l'oxygène dans la réaction. — Méthodes anaérobies	48
CONCLUSIONS.	55
BIBLIOGRAPHIE	57

